



**ORGANIC ACIDS PRODUCING MICROORGANISM AND METHOD FOR
PRODUCING ORGANIC ACIDS USING THE SAME**

AC

Patent number: KR2002003712
Publication date: 2002-01-15
Inventor: JANG HO NAM (KR); LEE PYEONG CHEON (KR); LEE
SANG YEOP (KR); LEE U GI (KR)
Applicant: BIOINFOMATIX INC (KR)
Classification:
- international: **C12P7/46; C12P7/54; C12P7/56; C12P7/40;** (IPC1-7):
C12N1/20
- european: C12P7/46; C12P7/54; C12P7/56
Application number: KR20000036645 20000629
Priority number(s): KR20000036645 20000629

Also published as:

 WO0200846 (A1)
 US2003113885 (A1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for KR2002003712

Abstract of corresponding document: **US2003113885**

A novel microorganism capable of producing organic acids, Mannheimia sp. 55E, and a process for producing organic acid through anaerobic and aerobic incubation using the novel microorganism are provided. The method of producing an organic acid using the microorganism involves incubating Mannheimia sp. 55E with Accession Number KCTC 0769BP in a medium under anaerobic or aerobic conditions and obtaining an organic acid from the medium. Mannheimia sp. 55E produces succinic acid, lactic acid, and formic acid under anaerobic conditions saturated with CO₂, and succinic acid, lactic acid, acetic acid, and formic acid under aerobic or N₂ anaerobic conditions. Mannheimia sp. 55E is a facultative anaerobe tolerant of oxygen. Thus, the use of Mannheimia sp. 55E in producing organic acids can eliminate a problem of process instability, which would occur by the presence of oxygen in a fermentation process of producing organic acids using an obligate anaerobic microorganism.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 등록특허공보 (B1)

(51) . Int. Cl. 7
C12N 1/20

(45) 공고일자 2003년02월14일
(11) 등록번호 10 -0372218
(24) 등록일자 2003년01월30일

(21) 출원번호	10 -2000 -0036645	(65) 공개번호	특2002 -0003712
(22) 출원일자	2000년06월29일	(43) 공개일자	2002년01월15일

(73) 특허권자 바이오인포메틱스 주식회사
 서울특별시 서초구 서초1동 1424 -2

(72) 발명자 이상엽
 대전광역시유성구전민동엑스포아파트212동702호
 장호남
 대전광역시유성구어은동한빛아파트132동803호
 이평천
 대전광역시유성구궁동과기원아파트101동201호
 이우기
 대전광역시서구둔산동동지아파트101동906호

(74) 대리인 이영필

심사관 : 김재현

(54) 유기산을 생산하는 균주 및 이를 이용한 유기산의 생산방법

요약

본 발명은 신규한 유기산 생산 균주인 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP) 및 전기 균주를 혐기적인 또는 호기적인 조건에서 배양하여 유기산을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 유기산을 생산하는 균주를 이용한 유기산의 생산방법은 유기산 생산균주인 만헤이미아 스피시스 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP) 및 전기 균주를 혐기적 조건 또는 호기적 조건에서 배양하고, 이로부터 유기산을 수득하는 공정을 포함한다. 본 발명의 만헤이미아속 55E는 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서는 숙신산, 젖산 및 개미산을 생산하고, 호기적 및 질소로 포화된 혐기적 조건에서는 숙신산, 젖산, 초산 및 개미산을 생산하는, 산소에 대한 저항성이 높은 통성혐기성 균주이기 때문에, 전기 균주를 이용하여 유기산을 생산하는 방법은 절대 혐기성 균주를 이용하여 유기산을 생산하는 종래의 방법에 비하여 산소 등의 노출로 인한 발효공정의 불안정성을 획기적으로 제거할 수 있을 것이다.

배고도

도 5

개이어

유기산, 숙신산, 젖산, 만헤이미아속 55E, 통성혐기성 균주

평에서

도면의 간단한 설명

도 1은 만헤이미아속 55E의 16S rDNA분석으로 작성된 진화계통수(phylogenetic tree)이다.

도 2는 만헤이미아속 55E의 형태적인 특성을 나타낸 주사전자현미경(SEM) 사진이다.

도 3은 이산화탄소로 포화된 혐기조건에서 만헤이미아속 55E의 배양 특성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 질소로 포화된 혐기조건에서 만헤이미아속 55E의 배양 특성을 나타낸 그래프이다.

도 5는 호기조건에서 만헤이미아속 55E의 배양 특성을 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 유기산을 생산하는 균주 및 이를 이용한 유기산의 생산방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 신규한 유기산 생산 균주인 만헤이미아속 55E(*Mannheimia* sp. 55E) 및 전기 균주를 혐기적 또는 호기적 조건에서 배양하여 유기산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

현재 석유화학공업의 발달로 인하여 대부분의 화학물질들이 석유 및 천연가스로부터 생산되고 있으나, 최근 지구온난화 현상 등 환경문제의 대두로 전세계적으로 환경규제가 강화되어, 화학물질의 생산을 위한 대체공정의 개발에 대한 요구가 증가되고 있다. 이에 따라, 미생물 배양기술과 유전공학기술의 획기적인 발달에 힘입어 생물공정에 의한 생물학적 물질(biochemical)의 생산이 점차 석유화학공정에 대하여 경쟁력을 갖게 되었다. 생물학적인 방법은 값싼 재생자원(renewable resource)을 원료로서 이용하고, 이산화탄소 등 지구온난화가스의 발생을 공정상에서 억제할 수 있기 때문에 환경문제를 근본적으로 해결할 수 있는 환경친화적 공정으로 알려져 있으므로, 균주개발 및 공정개선 등 원가절감을 위한 연구가 확대되고 있는 추세이다. 아울러, 생물학적 물질의 시장성이 매우 높아지고 있어, 미생물을 이용하여 생물자원(biomass)으로부터 생물학적 물질의 생산에 대한 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다.

이러한 생물학적 물질 중에서, 숙신산(succinic acid) 및 젖산(lactic acid)은 생분해성 플라스틱 모노머, 식품첨가제, 기타 유기화합물의 중간체 등 그 다양한 이용성과 가격경쟁력 때문에, 이들 물질에 대한 관심이 날로 증가하는 추세이다.

숙신산의 생물학적 생산에 대한 연구는 1938년 록우드(Lockwood) 등이 미생물인 푸사리움 마티(*Fusarium martii*)를 이용하여 당으로부터 18%의 수율로 숙신산을 생산한 것을 발표하면서 시작되었다. 그 후, 숙시니비브리오 텍스트리노솔벤스(*Succinivibrio dextrinosolvens*), 피브로박터 숙시노게네스(*Fibrobacter succinogenes*) 또는 루미노코커스 플라브파시엔스(*Ruminococcus flavefaciens*) 등을 포함한 다양한 종류의 혐기성 미생물이 포도당대사를 통하여

숙신산을 최종산물로 생성하는 것으로 보고된 이래(참조: Zeikus, Annu. Rev. Microbiol., 34:423 -464, 1980), 과량의 탄소 존재시에 포도당으로부터 높은 농도와 수율로 숙신산을 생산하는 것으로 알려진 엔에어로바이오스피리움 속시니시프로두센스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)를 제외하고는, 산업적으로 유용한 높은 수율로 숙신산을 생산하는 균주는 보고되지 않았다(참조: David et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 26:498 -504, 1976). 그러나, 엔에어로바이오스피리움 속시니시프로두센스는 절대 혐기적인 미생물이기 때문에, 이를 이용하여 숙신산을 생산하는 발효 공정은 미량의 산소에 노출되더라도 공정자체에 불안정한 영향을 미치는 단점이 있다.

한편, 미생물의 발효를 통해 유기산을 경제적으로 생산하기 위하여는, 생산수율, 발효의 조건 등과 같은 여러가지 문제점의 해결이 선행되어야 하는데, 그중에서도 가장 우선되어야 할 문제점은 새로운 균주의 개발이다. 현재 사용되는 대부분의 미생물은 혐기성 미생물로서, 이의 배양을 위한 설비비용이 비싸고, 미량의 산소에 의한 발효실패의 확률이 높기 때문에, 산소에 대해 저항성을 가지면서 유기산의 생산성이 높은 균주를 개발하려는 노력이 절실히 요구되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 산소에 대한 저항성을 갖고, 고도의 수율로 유기산을 생산하는 균주를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 소의 위액에서 분리하고 동정한 통성혐기성 균주(facultative anaerobe)인 만헤이미아속 55E(*Mannheimia* sp. 55E)가 혐기적 및 호기적 조건하에 유기산을 생산하며, 산소에 대하여 강한 저항성을 갖는 신규한 통성혐기성 균주임을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 유기산 생산 균주인 만헤이미아속 55E(*Mannheimia* sp. 55E, KCTC 0769BP)를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 전기 균주를 이용하여 혐기적 및 호기적 조건하에서, 유기산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명자들은 산소에 대한 저항성을 갖고, 고도의 수율로 유기산을 생산하는 신규한 균주를 분리하기 위하여, 소의 위액에서 얻은 시료들을 희석하고, 고체배지에서 배양하여 단일 집락(colony)을 형성하게 한 다음, 이들을 과량의 이산화탄소가 존재하는 성장배지에서 배양하여, 숙신산을 생산할 수 있는 능력을 보이는 균주를 선별하였다. 선별된 균주에서 수득한 16S 리보솜 DNA(16S rDNA)의 상동성을 비교하고 분석한 결과, 만헤이미아 배리애나(*Mannheimia vari aena*)와 95.1%의 상동성(similarity)을 가지는 것으로 밝혀져, 이를 토대로 전기 선별된 균주가 지금까지 발견되지 않은 새로운 미생물임을 확인하였는 바, 이를 만헤이미아속 55E(*Mannheimia* sp. 55E)로 명명하고, 2000년 4월 10 일자로 국제기탁기관인 생명공학연구소(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52소재)에 기탁번호 (KCTC 0769BP) 로 기탁하였다.

본 발명의 만헤이미아속 55E 균주는 통성혐기성, 그람음성, 비운동성의 단간(rod) 또는 코코바실라이(cocobacilli)균으로서, 내생포자(endospore)를 생성하지 않는 특성을 가지며, 숙신산, 젖산, 초산, 개미산 등의 유기산을 생산할 수 있다. 전기 균주는 30 내지 50℃의 범위에서 생육이 관찰되나, 최적생육온도는 39℃이고, pH 6.0 내지 7.5의 범위에서 생육이 관찰되나, 최적생육 pH는 6.5이다.

전기 만헤이미아속 55E 균주를 사용하여 유기산을 생산하는 방법은 혐기적 또는 호기적 조건에서 만헤이미아속 55E(*Mannheimia* sp. 55E, KCTC 0769BP)를 배양하고, 이로부터 유기산을 수득하는 단계를 포함한다: 우선, 혐기적 조건은 이산화탄소 또는 질소를 0.1 내지 0.4vvm, 바람직하게는 0.2 내지 0.3vvm, 가장 바람직하게는 0.25vvm의 유속으로 공급하여 조성되고, 호기적 조건은 산소를 0.5 내지 1.0vvm, 바람직하게는 0.7 내지 0.8vvm, 가장 바람직하게는 0.75vvm의 유속으로 공급하여 조성된다. 배양에 사용되는 배지는 특별히 제한되는 것은 아니나, 포도당의 함량이 바람

직하게는 5 내지 60g/L이고, 가장 바람직하게는 20g/L이며, 배양은 35 내지 45℃, 바람직하게는 38 내지 41℃, 가장 바람직하게는 39℃의 온도와, pH 6.0 내지 7.5, 바람직하게는 pH 6.3 내지 6.7, 가장 바람직하게는 pH 6.5의 조건하에서 수행된다. 이때, 혐기적 조건에서는 젖산, 초산, 숙신산 또는 개미산을 생산하는데, 숙신산의 수율을 높이기 위해서는 이산화탄소를 사용하여 혐기적인 조건을 조성함이 가장 바람직하고, 젖산의 수율을 높이기 위해서는 질소를 사용하여 혐기적인 조건을 조성함이 가장 바람직하다. 또한 호기적 조건에서는 젖산, 초산 또는 개미산을 생산하고, 그 중 젖산의 수율이 가장 높다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 균주의 분리 및 16S 소포체 DNA(16S rDNA)의 염기서열 분석을 통한 동정

소에서 수득한 위액(rumen fluid) 1ml을 20g/L의 포도당, 5g/L의 폴리펩톤, 5g/L의 효모추출물, 3g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 5g/L의 $(NH_4)_2SO_4$, 0.2g/L의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2g/L의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 5g/L의 Na_2CO_3 로 구성된 배지로 100배 희석하고, 이를 전기 배지에 1% 아가로스가 포함된 고체배지에 도말하여 10시간 동안 배양하였다. 배양하여 생겨난 집락(colony) 중, 단독 집락을 선별하고, 이를 이산화탄소로 포화된 전기 배지 3ml에서 10시간 동안 배양한 후, 배지내에 포함된 숙신산의 양을 HPLC(Aminex HPX -87H column, Bio -Rad, USA)로서 측정하여, 숙신산을 50% 이상의 수율로 생산하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 생리적인 특성을 조사한 결과, 그람음성이고, 내생포자(endospore)를 생성하지 않으며, 30 내지 50℃의 범위에서 생육이 관찰되나, 최적생육온도는 39℃이고, pH 6.0 내지 7.5의 범위에서 생육이 관찰되나, 최적생육 pH는 6.5임을 알 수 있었다.

전기 균주로 부터, 로첼(Rochelle)의 방법(참조: Rochelle et al., FEMS Microbiol. Lett., 100:59 -66, 1992)을 응용하여 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 분리된 게놈 DNA를 주형으로 사용하고, 프라이머1: 5(-AGAGT TTGATCMTGGCTCAG -3(서열번호 1)과 프라이머2: 5(-AAGGAGGTGWTCCARCC -3(서열번호 2)를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행함으로써, 16S rDNA를 증폭하였다. 이어, 증폭된 16S rDNA의 염기서열을 알아내고, DNA 염기서열 분석프로그램인 필립(PHYLIP, phylogeny inference package, version 3.5c)을 이용하여 16S rDNA의 염기서열의 상동성을 분석하였다(참조: 표 1, 도 1). 표 1은 각 종간의 상동성을 나타내며, 도 1은 이러한 상동성 분석으로 작성된 진화계통수(phylogenetic tree)를 나타낸다.

하기 표 1 및 도 1에서 보듯이, 분리된 균주는 파스퇴렐라시에과(Pasteurellaceae family)에 속하는 신중세균으로 판명되었으며, 가장 가까운 균주인 만헤이미아 배리아나(Mannheimia variaena)와 95.1%의 유사성을 보여, 만헤이미아속(Mannheimia genus)의 신종임을 알 수 있었으므로, 새로이 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E)로 명명하고, 이를 2000년 4월 10일자로 국제기탁기관인 생명공학연구소(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52소재)에 기탁번호(KCTC 0769BP)로 기탁하였다.

[표 1]

종 명	코드번호	상동성
만헤이미아 바리게나(Mannheimia varigena) CCUG 38462T	AF053893	95.1
만헤이미아 그라눌로마티스(Mannheimia granulomatis) ATCC 49244T	AF053902	94.9
만헤이미아 루미날리스(Mannheimia ruminantis) CCUG 38470T	AF053900	94.7
만헤이미아 글루코시다(Mannheimia glucosida) CCUG 38457T	AF053889	94.7
파스퇴렐라 트레할로시(Pasteurella trehalosi) NCTC 11550	U57073	94.7
파스퇴렐라 다그마티스(Pasteurella dagmatis) ATCC 43325T	M75051	94.3
만헤이미아 헤몰라이티카(Mannheimia haemolytica) NCTC 9380T	AF060699	94.1
파스퇴렐라 아비움(Pasteurella avium) NCTC 11297T	M75058	94.0
파스퇴렐라 아에로게네스(Pasteurella aerogenes) ATCC 27883T	M75048	94.0
파스퇴렐라 베틀야(Pasteurella bettyae) CCUG 2042T	L06088	94.0
파스퇴렐라 볼란티움(Pasteurella volantium) NCTC 3438T	M75070	93.8
파스퇴렐라 마이리이(Pasteurella mairii) CCUG 27189T	AF024532	93.8
파스퇴렐라 톨토시다(Pasteurella multocida) NCTC 10322T	M35018	93.8
파스퇴렐라 랑가엔시스(Pasteurella langaaensis) ATCC 43328T	M75053	93.7
파스퇴렐라 갈리나룸(Pasteurella gallinarum) NCTC 11188T	M75059	93.5
파스퇴렐라 스토마티스(Pasteurella stomatis) ATCC 43327T	M75050	93.2
파스퇴렐라 카니스(Pasteurella canis) ATCC 43326T	M75049	93.1
헤모필루스 인플루엔자 T(Haemophilus influenzae T)	M35019	92.5
파스퇴렐라 프네우모트로피카(Pasteurella pneumotropica) NCTC 8141T	M75083	92.3
파스퇴렐라 아나티스(Pasteurella anatis) ATCC 43329T	M75054	92.0
파스퇴렐라 테스투디니스(Pasteurella testudinis) CCUG 19802T	L06090	91.3
비브리오 콜레라(Vibrio cholerae) ATCC 14035T	Z21856	87.8
대장균(E. coli)	J01695	86.6

실시예 2: 만헤이미아속 55E의 특성

만헤이미아속 55E(KCTC 0769BP)를 만헤이미아 속이 잘 성장할 수 있는 고체배지로 알려진 혈청고체배지(blood agar)에서 39℃의 온도로 24시간 동안 배양한 다음, 형성된 집락(colony)을 관찰한 결과, 집락은 옅은 회색(greyish)의 부드러운(smooth) 표면을 가지며, 직경이 약 1 내지 2mm로 측정되었다. 또한, 주사전자현미경(SEM)을 이용하여, 만헤이미아속 55E의 단세포를 관찰하였다(참조: 도 2). 도 2에서 보듯이, 만헤이미아속 55E는 크기가 0.3 X 1.0 내지 0.5 X 1.0μm인 비운동성의 단간(rod)형 또는 코코바실라리(cocobacilli)형의 형태임을 알 수 있었다.

실시예 3: 이산화탄소가 포화된 혐기조건하에서의 발효특성

만헤이미아속 55E의 발효능을 알아보기 위하여, 이산화탄소가 포화된 혐기적 조건 하에 배양하고, 이로부터 생산되는 반응 산물을 측정하였다.

먼저, 20g/L의 포도당, 5g/L의 폴리캡톤, 5g/L의 효모추출물, 3g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 1g/L의 $(NH_4)_2SO_4$, 0.2g/L의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2g/L의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 10g/L의 $MgCO_3$ 로 구성된 전배양 배지 100ml를 작제하고, 이에 탄소가스를 주입한 다음, 만헤이미아속 55E를 접종한 후, 39℃에서 9시간동안 전배양을 수행하였다. 이어, 20g/L의 포도당, 5g/L의 폴리캡톤, 5g/L의 효모추출물, 3g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 5g/L의 $(NH_4)_2SO_4$, 0.2g/L의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2g/L의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 5g/L의 Na_2CO_3 로 구성된 본배양 배지 0.9L를 2.5L의 배양조에 넣고, 100ml의 전배양된 숙신산 발효미생물을 접종한 다음, 39℃의 온도와 pH 6.5의 조건하에 탄소가스를 0.25vvm의 유속으로 공급하면서 회분식 배양을 수행하였다. 배양 진행 중, 시간별로 배양기로부터 배지를 채취하고, 이로부터 세포농도, 숙신산, 포도당, 초산 및 개미산의 양을 측정하였다. 배양액 내의 세포농도는 분광광도계 (spectrophotometer, Ultra spec 3000, Pharmacia Biotech., Sweden)를 이용하여 측정하고, 숙신산, 포도당, 초산 및 개미산의 양은 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다(참조: 도 3). 도 3은 배양시간에 따른 세포농도(●), 숙신산(○), 포도당(■), 젖산(◇) 및 개미산(□)의 농도변화를 나타낸 그래프이다. 도 3에서 보듯이, 7.5시간의 배양 후에 소모된 포도당의 농도는 19.8g/L이고, 생성된 숙신산의 농도는 13.3g/L이며, 이에 따른 숙신산의 수율(생성된 숙신산의 양/소모된 포도당의 양)은 67%이고, 숙신산의 부피생산성(생성된 숙신산의 농도/소요된 시간)이 1.8g/L/h임을 알 수 있었다.

본 발명의 만헤이미아속 55E를 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서 배양하여 수득하는 숙신산의 생산방법은, 절대 혐기성 균주인 언에어로바이오스피리움 숙시니시프로두센스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*, ATCC 29305)를 혐기적 조건에서 배양하여 수득할 수 있는 숙신산의 생산방법보다, 수율면에서는 다소 낮았으나, 부피생산성의 면에서는 약 80%이상 향상된 방법임을 알 수 있었다(참조; Lee et al., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 24:549 -554, 1999).

실시예 4: 질소가 포화된 혐기조건하에서의 발효특성

질소가 포화된 혐기조건에서의 발효능을 확인하기 위하여, 질소를 0.25vvm의 유속으로 공급하는 것을 제외하고는, 실시예 3과 동일한 방법으로 22시간 동안 배양하였다. 발효 진행 중, 시간별로 발효기로부터 배지를 채취하고, 실시예 3과 동일한 방법으로 세포농도, 젖산, 포도당, 및 초산의 양을 측정하였다(참조: 도 4). 도 4는 발효시간에 따른 세포농도(●), 숙신산(○), 젖산(◇), 포도당(■), 개미산(□) 및 초산(△)의 농도변화를 나타낸 그래프이다. 도 4에서 보듯이, 실시예 3의 결과와는 달리, 만헤이미아속 55E는 질소가 포화된 혐기상태에서는 젖산을 주된 산물로 생산하고, 숙신산은 9% 이하의 아주 낮은 수율로 생산하였다. 이때, 소모된 포도당의 농도는 18g/L이고, 얻어진 젖산의 농도는 9.8g/L이며, 이에 따른 젖산의 수율은 54%이고, 젖산의 부피생산성이 0.45g/L/h임을 알 수 있었다.

상기 결과로부터, 본 발명의 균주를 이용하여 숙신산을 생산하는 경우 이산화탄소가 필수적임을 알게 되었고, 아마도 본 발명의 균주는 이산화탄소를 고정하여 숙신산의 생산 과정에 이용할 것으로 예상되었다.

실시예 5: 산소가 포화된 호기조건하에서의 발효특성

호기 조건에서의 발효능을 확인하기 위하여, 산소를 0.75vvm의 유속으로 공급하는 것을 제외하고는, 실시예 3과 동일한 방법으로 14시간 동안 배양하였다. 발효 진행 중, 시간별로 발효기로부터 배지를 채취하고, 실시예 3과 동일한 방법으로 세포농도, 젖산, 포도당, 및 초산의 양을 측정하였다(참조: 도 5). 도 5는 발효시간에 따른 세포농도(●), 젖산(◇), 포도당(■) 및 초산(△)의 농도변화를 나타낸 그래프이다. 도 5에서 보듯이, 본 발명의 균주는 산소가 존재하는 호기적 조건하에 배양하여도 세포농도가 OD₆₆₀ 기준으로 11까지 증가하였으므로, 오랜 시간의 산소에 대한 노출에도 세포성장에는 영향을 받지 않는 통성혐기성 균주(facultative anaerobe)임을 알 수가 있었다. 이때, 숙신산 및 개미산을 전혀 생산하지 않으며, 젖산을 주된 산물로 생산하는데, 소모된 포도당의 농도는 22g/L이고, 얻어진 젖산의 농도는 9.8g/L이며, 이에 따른 젖산의 수율은 45%이고, 젖산의 부피생산성이 0.7g/L/h임을 알 수 있었다.

이상의 결과는 본 발명의 균주가 산소에 대하여 강한 저항성을 가지는 통성혐기성 균주임을 나타내므로, 이산화탄소로 포화된 혐기조건에서 배양하여 숙신산을 생산할 때, 용존산소를 제거하는 과정이 불필요하고, 이산화탄소의 양이 충분하다면 배양중에 산소의 유입이 있더라도 숙신산의 생산에는 별다른 영향을 미치지 못할 것으로 예측되었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 신규한 유기산 생산 균주인 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E) 및 전기 균주를 혐기적 및 호기적 조건에서 배양하여 유기산을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 만헤이미아속 55E는 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서는 숙신산, 젖산 및 개미산을 생산하고, 호기적 및 질소로 포화된 혐기적 조건에서는 숙신산, 젖산, 초산 및 개미산을 생산하는, 산소에 대한 저항성이 높은 통성혐기성 균주이기 때문에, 전기 균주를 이용하여 유기산을 생산하는 방법은 절대 혐기성 균주를 이용하여 유기산을 생산하는 종래의 방법에 비하여 산소 등의 노출로 인한 발효공정의 불안정성을 획기적으로 제거할 수 있을 것이다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

혐기적 및 호기적 조건에서 유기산을 생산할 수 있는 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP).

청구항 2.

제 1항의 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP)를 이산화탄소 또는 질소로 포화된 혐기적 조건하에 포도당의 함량이 5 내지 60g/L인 배지에서 배양하고, 이로부터 유기산을 수득하는 공정을 포함하는 유기산의 생산 방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서,

유기산은 숙신산, 개미산, 초산 또는 젖산인 것을 특징으로 하는

유기산의 생산방법.

청구항 4.

제 2항에 있어서,

배양은 35 내지 45℃의 온도와 pH 6.0 내지 7.5에서 이산화탄소 또는

질소를 0.1 내지 0.4vvm의 유속으로 공급하면서 수행하는 것을

특징으로 하는

유기산의 생산방법.

청구항 5.

제 1항의 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP)를 포도당의 함량이 5 내지 60g/L인 배지에서, 이산화탄소를 0.1 내지 0.4vvm의 유속으로 공급하면서 35 내지 45℃의 온도와 pH 6.0 내지 7.5의 조건으로 배양하고, 이로부터 숙신산을 수득하는 공정을 포함하는 숙신산의 생산방법.

청구항 6.

제 1항의 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP)를 포도당의 함량이 5 내지 60g/L인 배지에서, 질소를 0.1 내지 0.4vvm의 유속으로 공급하면서 35 내지 45℃의 온도와 pH 6.0 내지 7.5의 조건으로 배양하고, 이로부터 젖산을 수득하는 공정을 포함하는 젖산의 생산방법.

청구항 7.

제 1항의 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP)를 호기적 조건하에 포도당의 함량이 5 내지 60 g/L인 배지에서 배양하고, 이로부터 유기산을 수득하는 공정을 포함하는 유기산의 생산방법.

청구항 8.

제 7항에 있어서,

유기산은 젖산 또는 초산인 것을 특징으로 하는

유기산의 생산방법.

청구항 9.

제 7항에 있어서,

배양은 35 내지 45℃의 온도와 pH 6.0 내지 7.5에서 산소를 0.5 내지

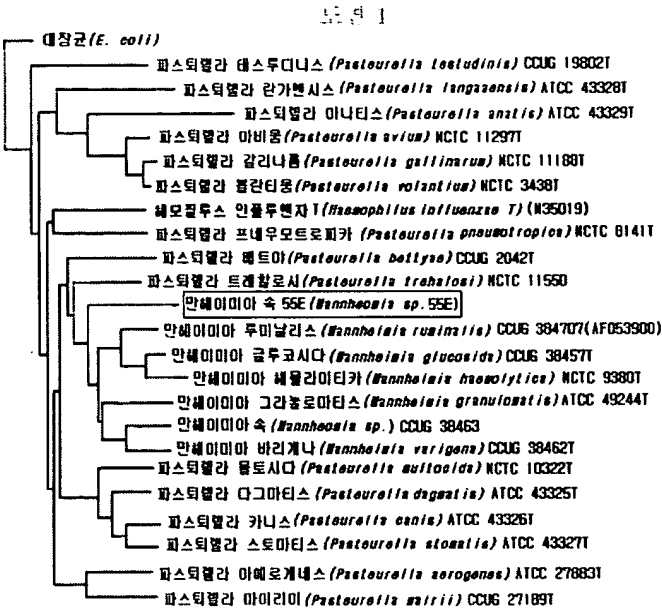
1.0vvm의 유속으로 공급하면서 수행하는 것을 특징으로 하는

유기산의 생산방법.

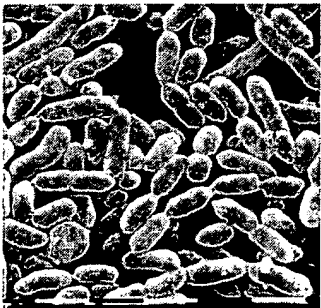
청구항 10.

제 1항의 만헤이미아속 55E(Mannheimia sp. 55E, KCTC 0769BP)를 포도당의 함량이 5 내지 60g/L인 배지에서, 산소를 0.5 내지 1.0vvm의 유속으로 공급하면서 35 내지 45℃의 온도와 pH 6.0 내지 7.5의 조건으로 배양하고, 이로부터 젖산을 수득하는 공정을 포함하는 젖산의 생산방법.

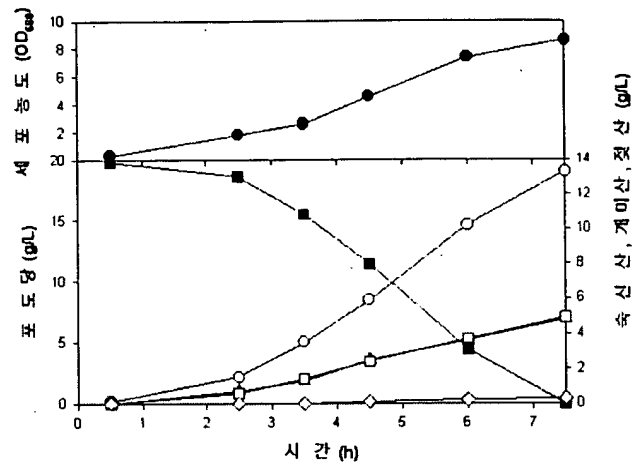
도면



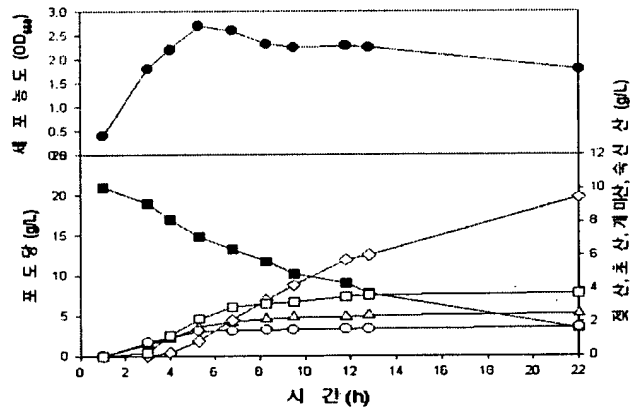
도면 2



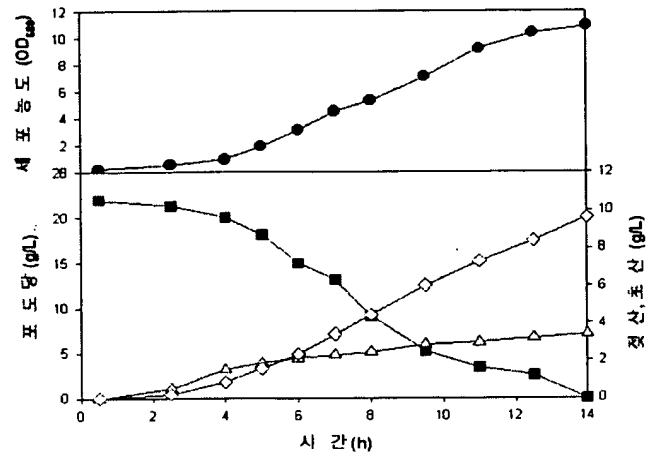
도면 3



도면 4



도면 5



=221? Lpsfb Bewbodfe Jotuj uvuf pg Tdj f odf boe Uf di oprphz =231? Pshboj d Bdj e
Qspevdj o
h Nj dspshbojtn boe Qspdfitt gps Qsfqbsj oh Ps hboj d Bdj et Fnqmpzj oh ui f Tbnf
=271? 3 '
mu<281? LPOBWO 2/6 =321? 2 =322? 31 =323? EOB =324? Bsuj gj d
j bm Tf r v f odf =331? =334? qsj n f s =511? 2 bhhhuuhbu dnuhhdudbh

31 =321? 3 =322? 28 =323? EOB =324? Bsuj gj dj bm Tf r v f odf =331' hu
< =334? qsj n f s =511? 3 bhhhbhhuhx uddbsdd
28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.